

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NITROSIL COMPLEXOS COM AÇÃO ANTIBACTERIANA FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*

Thuanny M. de Sousa^a, Dayana P. S. Penha^a, Daniel de L. Pontes^a, Ana C. F. de B. Pontes^a e Francisco O. N. da Silva^{a*}

^aInstituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59078-970, Natal – RN, Brasil

Recebido em 29/08/2019; aceito em 27/11/2019; publicado na web em 10/02/2020

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NITROSYL COMPLEXES WITH ANTIBACTERIAL ACTION AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*. The compounds nitrosyl *cis*-[Ru(bpy)(phen)TU(NO)](PF₆)₃ (compound 1) and *cis*-[Ru(bpy)(phen)(4-N-Imd)(NO)](PF₆)₃ (compound 2) (bpy = 2,2'-bipyridine, phen = 1,10'-phenanthroline, TU = thiourea and 4-N-Imd = 4-nitroimidazole) were synthesized and characterized by UV-visible, infrared spectroscopies and electrochemical techniques. In the study of the reactivity it was possible to verify the nitric oxide labilization by square wave voltammetry and a photochemical upon blue light irradiation. This feature is very important for a potential application in phototherapy. Additionally, the antibacterial activity of the nitrosyl complexes was tested against gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, it has been observed that the complexes are capable of inhibiting the growth of such microorganisms.

Keywords: ruthenium; nitric oxide; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUÇÃO

A molécula de óxido nítrico tornou-se uma das mais importantes moléculas de sinalização intercelular identificada nos anos 1980.¹⁻³ A descoberta de que o NO está envolvido em múltiplos processos fisiológicos como a neurotransmissão,⁴⁻⁷ pressão arterial⁸⁻¹¹ e participação na capacidade do sistema imunológico no combate a células tumorais e parasitas intracelulares¹²⁻¹⁶ tem expandido a quantidade de pesquisas no desenvolvimento de novos compostos capazes de liberar essa molécula.

Sínteses e estudos sobre a cinética desses compostos têm sido de fundamental importância para viabilizar sua aplicação como metalofármacos.¹⁷ Nitrosilo complexos de rutênio têm despertado bastante interesse devido à boa estabilidade térmica, baixa toxicidade, solubilidade em água e capacidade de liberar NO de modo fotoquímico e através de redução química.¹⁸⁻²⁰

A formação de complexos de rutênio doadores de NO em alvos biológicos, também dependem da interação bioquímica dos ligantes coordenados ao centro metálico. Os ligantes polipiridínicos, tais como 2,2'-bipiridina e 1-10'-fenantrolina apresentam coordenação bidentada e por serem quelatos resultam em compostos de coordenação relativamente estáveis,^{21,22} proporcionando uma intercalação na interação com o DNA²³ de modo a apresentar ação como agente antitumoral²⁴⁻²⁶ e agente antimicrobiano.²⁷

Atualmente, uma grande preocupação alegada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são as mortes causadas por doenças bacterianas.²⁸ O uso de antibióticos como alternativa para solucionar esse problema tem se tornado ineficaz, devido à grande resistência adquirida por esses microorganismos^{29,30} e ao uso incorreto e indiscriminado desses medicamentos, os quais conduzem a difíceis tratamentos.³¹⁻³⁷

Uma estratégia utilizada para favorecer a atividade antimicrobiana é a complexação de moléculas a centros metálicos,^{38,39} sendo esse método uma alternativa viável no controle de infecções, pois compostos de coordenação com ligantes biologicamente relevantes são normalmente mais ativos do que os ligantes livres.^{40,41}

Visando o desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade biológica frente a bactérias, apresentamos a caracterização,

o comportamento fotoquímico e a atividade antimicrobiana dos compostos *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO⁺)](PF₆)₃, com L = 4-nitroimidazol (4-N-Imd) e tiouréia (TU) contra *Pseudomonas aeruginosa*.

EXPERIMENTAL

Reagentes

O tricloreto de rutênio hidratado - RuCl₃.XH₂O (Sigma Aldrich; 99%) foi utilizado como material de partida para as sínteses dos complexos. Os ligantes 2,2'-bipiridina, tiouréia, 4-nitroimidazol e 1,10'-fenantrolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem qualquer purificação adicional. *cis*-[Ru(bpy)(phen)Cl₂] foi preparado de acordo com procedimento descrito na literatura.⁴²

Sínteses dos compostos

Síntese dos complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO₂)](PF₆)₃

Esse composto foi preparado pela dissolução de 0,100 g (0,190 mmol) do complexo *cis*-[Ru(bpy)(phen)Cl₂] com 0,026 g (0,228 mmol) para o ligante 4-nitroimidazol (4-N-Imd) e 0,019 g (0,228 mmol) para a tiouréia (TU) em uma mistura de 10 mL etanol e água (1:1) sob condições de refluxo. Após 2 h adicionou-se nitrato de sódio (0,228 mmol) deixando nas mesmas condições para produzir os nitro complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO₂)](PF₆)₃. A mistura foi concentrada num evaporador rotativo até um volume de 8 mL, e o sólido foi precipitado pela adição de 2 mL de NH₄PF₆ 0,89 mol L⁻¹. O sólido foi separado por filtração e armazenado sob vácuo. Rendimento: 72% (L = 4-nitroimidazol) e 51% (L = tiouréia). C₂₅H₂₁F₆N₈O₅PRu (759,07): calcd. C 39,52%, H 2,76%, N 14,75%; obtido: C 39,22%, H 2,62%, N 14,49%. C₂₃H₂₂F₆N₇O₃PRuS (722,07): calcd. C 38,22%, H 3,04%, N 13,57%, S 4,43%; obtido: C 39,02%, H 2,82%, N 14,09%, S 4,08%. Esses dados foram obtidos em um analisador elementar CHN 2400 da Perkin-Elmer.

Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO)](PF₆)₃

Os complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO)](PF₆)₃ foram preparados pela dissolução de 0,100 g (0,144 mmol) *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO₂)](PF₆)₃ em 5 mL metanol sob uma atmosfera de argônio. A essa mistura

*e-mail: ordeleisilva@yahoo.com.br

foi adicionada uma solução concentrada de ácido trifluoroacético (2 mL) para promover a conversão de NO_2^- em NO^+ . Após 2 h, a mistura foi concentrada num evaporador rotativo até um volume de 7 mL, e o sólido foi precipitado pela adição de 2 mL de NH_4PF_6 0,89 mol L^{-1} . O sólido foi separado por filtração e armazenado sob vácuo. Rendimento: 69% (Para o composto *cis*-[Ru(bpy)(phen)(4-N-Imd)NO](PF₆)₃) e 59% (Para o composto *cis*-[Ru(bpy)(phen)(TU)NO](PF₆)₃). C₂₅H₂₁F₁₈N₈O₄P₃Ru (1033,07): calcd. C 29,04%, H 2,03%, N 10,84%; obtido: C 29,22%, H 2,14%, N 10,79%. C₂₃H₂₂F₁₈N₇O₂P₃RuS (996,07): calcd. C 27,70%, H 2,20%, N 9,84%, S 3,21%; obtido: C 28,02%, H 2,34%, N 9,96%, S 3,19%.

Equipamentos

Os espectros de absorção eletrônica foram registrados em um espectrofotômetro Uv-visível Agilent, modelo 8453, usando células de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em pastilhas de KBr, em um espectrofotômetro da Shimadzu, modelo FTIR-8400S, série IRAffinity-1, software IRSOLUTION, versão 1.60, com número de varredura de 32 e resolução 4 cm^{-1} . A análise de RMN 1D e 2D foram adquiridos em espectrômetro BRUKER Avance 300 MHz, em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆). Nos espectros de ¹H, os deslocamentos químicos foram referenciados por picos de hidrogênio pertencentes ao resíduo não-deuterado em relação ao TMS. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato modelo Epsilon da Bioanalytical Systems, Inc (BASi). Foi utilizada uma célula eletroquímica constituída por três eletrodos: Ag/AgCl como eletrodo de referência, eletrodo de trabalho de carbono vítreo e o auxiliar de platina. O eletrólito utilizado foi NaTFA 0,1 mol L^{-1} e pH = 3,0. As soluções analisadas foram desaeradas borbulhando argônio de alta pureza.

Estudo computacional

Os cálculos de otimização das estruturas dos complexos foram obtidos utilizando o programa Software Gaussian 09 (Gaussian Inc., Wallingford, CT) através da Teoria Funcional de Densidade (DTF) com o funcional híbrido B3LYP (restrito).⁴³⁻⁴⁵ Nos cálculos, foi utilizado o modelo de solvatação contínua polarizada para simular o efeito do solvente.⁴⁶ O conjunto de bases do potencial efetivo relativístico LANL2DZ^{47,48} foi usado para o átomo de Ru e o conjunto de bases 6-31G (d) para os outros átomos.^{47,48} A Teoria Funcional de Densidade Dependente do tempo (TD-DFT)⁴⁸ foi utilizada para calcular os espectros de UV-Visível a partir das estruturas otimizadas por DFT. Para a obtenção dos valores de energia e contribuições percentuais dos orbitais envolvidos nas transições eletrônicas bem como a simulação do efeito do solvente, foram utilizados os softwares Multiwfn e GaussSum 3.0.⁴⁹

Ensaios bacterianos

Microrganismo e condições de cultura

Foi utilizada neste trabalho a seguinte cepa de referência da American Type Culture Collection (ATCC): bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A avaliação da atividade antimicrobiana iniciou-se com o pré-inóculo, a qual foi preparado repicando a cepa do estoque em placas de Agar BHI, em seguida deixou-se na estufa por 24 horas a temperatura de 37 °C. Após esse período, preparou-se o inóculo ressuspendendo colônias do pré-inóculo em solução salina (soro fisiológico 0,9%) até atingir turbidez de 0,5 na escala McFarland, correspondente a 10⁸ UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro). Após o período de incubação,

a cultura bacteriana foi ajustada para a concentração final de 10⁶ unidades formadoras de colônias UFC/mL.

Concentração inibitória mínima (CIM)

A triagem da atividade antimicrobiana foi obtida utilizando o método de microdiluição em caldo, partindo da metodologia descrita por CLSI,⁵⁰ com algumas modificações. De acordo com essa metodologia, foram adicionados 100 μL do caldo Mueller Hinton (MH) em cada um dos poços, juntamente com adição de 100 μL do composto avaliado no primeiro poço, e em seguida transferindo-se 100 μL dessa mistura caldo-composto para os demais poços, realizando as diluições seriadas. Posteriormente, adicionou-se 100 μL de inóculo bacteriano a mistura caldo-composto contida em cada um dos poços, e em seguida as placas foram incubadas durante 18 horas a temperatura de 35 ± 2 °C sob agitação (200 rpm) e a avaliação da densidade óptica foi realizada em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) no comprimento de 595 nm. Os compostos foram diluídos em Agar BHI (Brain Heart Infusion) contendo 4% de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração inicial de 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o complexo 1 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o complexo 2. Os resultados da atividade antibacteriana dos compostos testados foram reportados pelas curvas de crescimento bacteriano *versus* concentração, obtidas pelo programa GraphPad Prism 5, e todas as curvas foram normalizadas de 0 a 100%. O crescimento bacteriano foi determinado em porcentagem a partir da razão da densidade óptica (DO) obtida em 595 nm no ensaio antibacteriano pela do controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos complexos

Os espectros eletrônicos dos nitro complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)L(NO₂)]⁺ (L= 4-N-Imd, TU) obtidos em meio aquoso apresentaram bandas intraligantes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ em 264 e 286 nm referente aos ligantes fenantrolina e biperidina, respectivamente.^{51,52} Tais transições são consistentes àquelas observadas para [Ru(phen)₂(ppn)]²⁺ [Ru(bpy)₂(ppn)]²⁺ em 262 nm e 285 nm, respectivamente.⁵³ Além disso, as transições de transferência de carga de metal para ligando (MLCT) são observadas na faixa de 405 a 420 nm.

Em comparação aos nitro complexos, o nitrosil mostrou um deslocamento para o azul das bandas MLCT $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy}/\text{phen})$ (de 420 para 330 nm) devido à grande estabilização dos orbitais $d\pi$ do metal, causada pela forte interação back-bonding do ligante NO^+ .⁵⁴ O espectro ainda apresenta uma transição de baixa absorvidade molar na região de 476 nm atribuída a MLCT $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}^+)$. Essa transição é comumente observada na faixa de 420-480 nm para uma série de nitrosil complexos com tetraminas [Ru(NH₃)₄(NO)X]²⁺, em que X = OH⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻, n = 2; X = OH₂, n = 3.^{55,56}

Cálculos TD-DFT são relatados para o complexo 2, em que o espectro calculado apresenta uma ótima concordância com o experimental quando o ligante NO encontra-se *trans* ao ligante biperidina (Figura 1). Assim, os dados do TD-DFT foram utilizados para reforçar a atribuição das transições eletrônicas.

A banda em 267 nm ocorre com maior contribuição dos orbitais HOMO-2 \rightarrow LUMO+6 (51%) atribuída à transição intraligante da fenantrolina. A banda em 294 nm tem maior contribuição dos orbitais HOMO-1 e LUMO+4 (33%) referente à intraligante da biperidina. Por último, a banda em 448 nm apresenta contribuição dos orbitais HOMO-4 \rightarrow LUMO (29%) correspondente à transição MLCT dos orbitais $d\pi$ do rutênio para os orbitais π^* do NO. O espectro eletrônico experimental do complexo 2 e seu espectro simulado apresentaram concordância ao analisar as energias das bandas com as contribuições dos orbitais (Figura 1). Além disso, as porcentagens relativas das

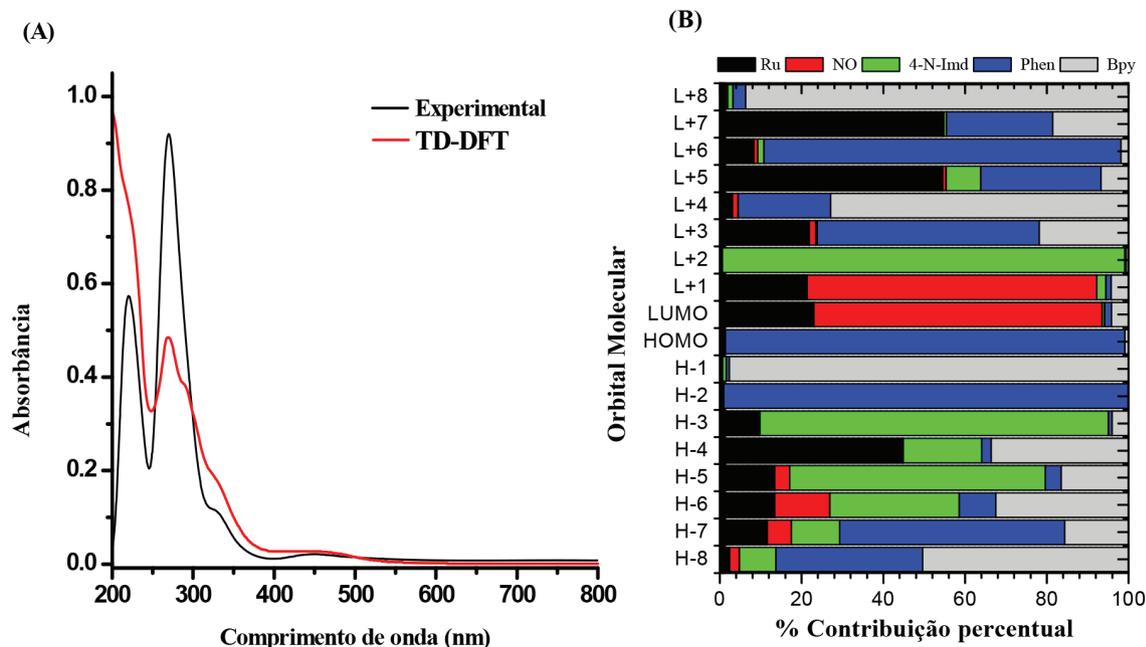
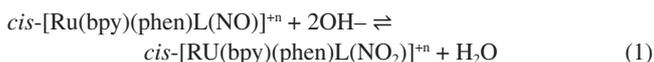


Figura 1. Espectro UV-Visível do complexo 2 em solução aquosa (A) Experimental (—) e calculado (—). (B). Percentual de contribuição dos orbitais moleculares selecionados

contribuições atômicas dos orbitais HOMO e LUMO são observadas na Figura 1b e indicam maior semelhança entre os dados quando o NO está *trans* a bipyridina.

No acompanhamento ácido-base com os nitrosil complexos (Figura 1S) observou-se que os espectros eletrônicos apresentaram uma dependência com relação ao pH. Dessa forma, à medida que aumenta o pH das soluções contendo os complexos, verificam-se bandas intensas na faixa 400-420 nm que são atribuídas à transição MLCT $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy}/\text{phen})$ dos nitro complexos formados conforme o equilíbrio exibido na equação 1.^{54,57-59}



No gráfico (Figura 2) de pH vs. absorvância verifica-se uma inflexão indicando um equilíbrio referente a interconversão NO^+ para NO_2^- em pH de 5,9 para o complexo com ligante 4-nitroimidazol e 6,7 para o complexo com a tiouréia. A diferença dos ligantes da esfera de coordenação influencia diretamente na intensidade da retrodoação que ocorre do metal para o ligante nitrosil, de maneira a alterar seu caráter eletrofílico. Assim, a constante de equilíbrio aumenta quanto maior a capacidade receptora dos ligantes coordenados ao metal.

Ao relacionar, na Tabela 1, os valores da constante de equilíbrio, frequência de estiramento e potencial de meia onda do par redox $\text{NO}^{+/0}$ dos nitrosil complexos presentes nesse trabalho e na literatura,⁴³ verifica-se que ao aumentar a deficiência eletrônica sobre o grupo nitrosil há uma intensificação no caráter eletrofílico deste ligante.⁵⁸ Por isso, constata-se uma maior frequência no estiramento do NO^+ e um maior potencial de redução.⁶⁰

Os espectros de infravermelho para os nitrosil complexos apresentam como principal característica o estiramento NO na região entre 1926 a 1942 cm^{-1} (Figura 2S). Esses valores associados ao movimento vibracional deste ligante indicam que o mesmo encontra-se coordenado ao centro metálico na forma NO^+ .^{58,61-66} De acordo com a literatura, quando o NO está coordenado pela geometria linear observa-se na região do infravermelho elevadas frequências de estiramento, como consequência do menor comprimento da ligação M-N e susceptibilidade de sofrer ataques nucleofílicos.^{67,68}

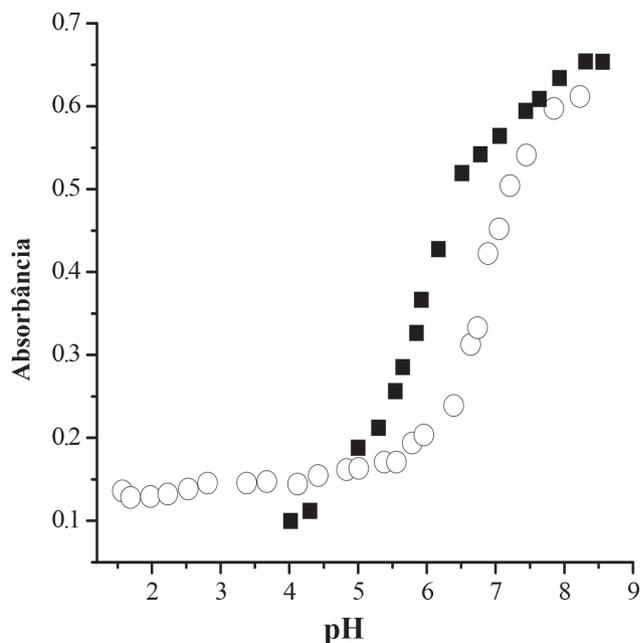


Figura 2. Titulação espectrofotométrica dos complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)(TU)NO](PF₆)₃ (○) e *cis*-[Ru(bpy)(phen)(4-N-Imd)NO](PF₆)₃ (■), nos λ_{max} de 422 e 417 nm, respectivamente

Outras bandas que se destacam nos espectros vibracionais são atribuídas ao $\nu\text{N-H}$ do ligante tiouréia em 3411 e $\delta(\text{NH}_2)$ em 1607 cm^{-1} no complexo 1 e as frequências em 3426, 1523, 1381 e 1321 cm^{-1} são típicas do ligante 4-nitroimidazol no complexo 2. Além dessas, verificam-se bandas em comum aos complexos associadas aos ligantes polipiridínicos, em torno de 1523-1451, 1433-1384, 716-770 e 845-558 cm^{-1} atribuídas aos $\nu\text{C}=\text{C}$, $\nu\text{C}=\text{N}$, $\delta\text{C-H}$ e νPF_6^- , respectivamente.⁴³

Para uma melhor caracterização dos nitrosil complexos, os espectros de RMN, 2D COSY e HSQC foram obtidos (Figuras 3S, 4S e 5S). A Figura 3 ilustra os espectros de hidrogênio para ambos os compostos. A presença de todos os sinais do anel N-heterocíclico

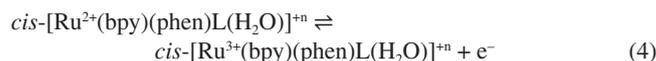
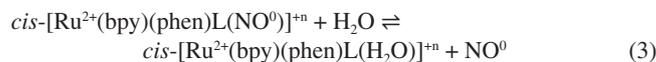
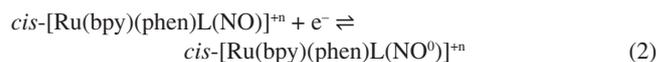
Tabela 1. Valores da K_{eq} , νNO^+ e $E_{1/2} NO^{+/0}$ referentes aos complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen)LNO]⁺ⁿ

Complexo	K_{eq}	νNO^+ (cm ⁻¹)	$E_{1/2}$ (mV) (NO ⁺⁰)
<i>cis</i> -[Ru(bpy)(phen)(TU)NO](PF ₆) ₃	3,06x10 ¹³	1926	32
<i>cis</i> -[Ru(bpy)(phen)(4-N-Imd)NO](PF ₆) ₃	6,10 x 10 ¹⁸	1942	117
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (TU)NO](PF ₆) ₃ ⁵⁴	1,42 x 10 ¹⁵	1932	37,5
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (ImN)NO](PF ₆) ₃ ⁵⁶	1,74 x 10 ¹⁶	1944	200

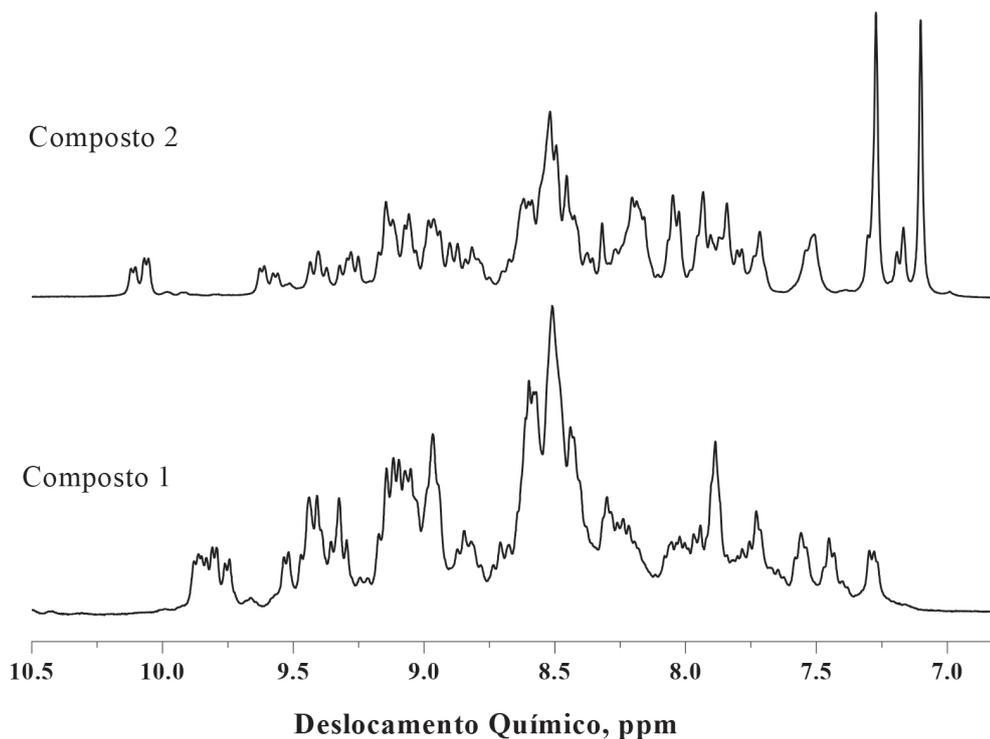
(7,1 e 7,3 ppm) sugere que o ligante 4-nitroimidazol está coordenado ao centro de metal através do átomo de nitrogênio (Tabela 1S). Com base no aparecimento de 16 sinais para os átomos hidrogênio, os espectros de RMN 2D dos compostos e comportamento similar descrito para sistemas de rutênio com ligantes polipiridínicos^{56,69} sugerem que todos átomos de hidrogênio não são equivalentes magneticamente.

O voltamograma cíclico dos nitrosil complexos constata-se um único processo quase reversível referente ao par redox NO⁺⁰, cujo potencial de meia-onda está em 32 mV para o complexo 1 e 117 mV para o complexo 2. A Figura 4 apresenta o voltamograma cíclico do complexo 2 em NaCF₃COO 0,1 mol L⁻¹. Ao comparar os valores de potenciais de meia-onda, observa-se que os complexos apresentam valores distintos em virtude do tipo predominante de interação (doador sigma ou receptor π) exercida pelos ligantes auxiliares L. Assim, o caráter π receptor do ligante 4-nitroimidazol no complexo 2 provoca no centro metálico uma deficiência de elétrons que enfraquece a transferência de carga do rutênio para o grupo nitrosil. Deste modo o NO experimenta uma diminuição na densidade eletrônica, a qual dificulta o processo redox. Quando o ligante coordenado é a tiouréia no complexo 1, observa-se um valor de potencial redox mais baixo devido ao maior poder σ doador deste ligante, fazendo que haja um aumento de densidade eletrônica sobre o NO. Vale ressaltar que na janela de potencial analisada não é possível observar o potencial referente ao par redox Ru^{3+/2+}, pois ao coordenar o grupo nitrosil o valor de potencial associado ao centro metálico é observado acima de 2,0 V.^{68,70}

Com o objetivo de reforçar esta atribuição, os voltamogramas de onda quadrada para os complexos *cis*-[Ru(bpy)(phen(L)(NO⁺))] ⁺ⁿ foram obtidos por uma mudança no tempo de polarização do eletrodo de trabalho, a -0,10 para ambos os compostos (Figuras 6S e 7S, respectivamente). Para esses complexos, observou-se um processo com maior intensidade de corrente em 32 mV para o complexo 1 e em 117 mV para o complexo 2, referente à oxidação que ocorre no ligante nitrosil de NO⁰ para NO⁺ e ainda, um segundo processo de menor corrente em 592 mV e 745 mV, respectivamente, atribuído a oxidação do centro metálico de rutênio no aqua complexo formado. Isso ocorre porque o processo de redução NO⁺ → NO⁰ é seguido por uma reação química, como pode-se observar nas equações propostas 2, 3 e 4,⁴³ em que ocorre a labilização do NO⁰ e coordenação de uma molécula de água.



Com o aumento do tempo de polarização, constatou-se um aumento da corrente de pico relacionada ao processo redox Ru^{III/II}. Um comportamento semelhante é encontrado para outros complexos semelhantes, conforme relatado na literatura.^{56,71}

**Figura 3.** Espectros RMN de ¹H para os compostos 1 e 2, em DMSO-d₆

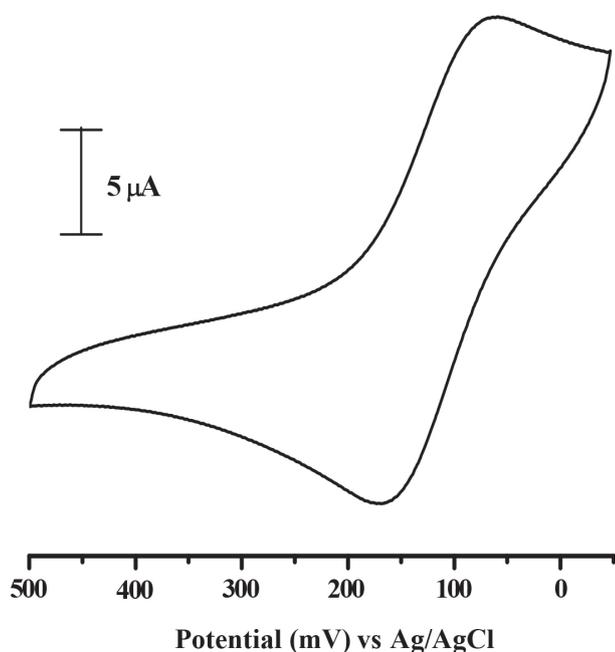
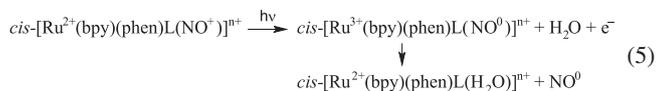


Figura 4. Voltamograma cíclico a 100 mV/s para o eletrodo de carbono vítreo na presença do íon complexo $[Ru(bpy)(phen)(4-N-Imd)NO]^{2+}$ em solução aquosa de $NaCF_3COO$ 0,1 mol L^{-1} pH 3,0

Estudo fotoquímico

A irradiação com LED azul nos complexos 1 e 2 foi realizada para determinar qualitativamente a liberação do óxido nítrico da esfera de coordenação. As fotólises foram acompanhadas por espectroscopia eletrônica em diferentes tempos de exposição ao LED. Ao analisar os espectros eletrônicos dos complexos, verifica-se que ao aumentar o tempo de exposição ocorre o aumento da intensidade da transição de transferência de carga na região entre 400 e 500 nm (Figura 8S). Dessa forma, as modificações no espectro sugerem que ocorreu liberação do ligante nitrosil. A irradiação de nitrosil complexos de rutênio em solução aquosa com fótons de energia resulta na redução do óxido nítrico e posteriormente, sua liberação, de modo que em seu lugar coordena-se uma molécula de água, formando o aqua complexo.^{43,72,73}

Na literatura Rose e Mascharak⁷⁴ propuseram dois tipos de mecanismos para liberação de NO de forma fotoquímica. O primeiro produz as espécies NO e $[Ru^{3+}\text{-solvente}]$, enquanto o segundo NO e $[Ru^{2+}\text{-solvente}]$, como produtos finais, equação 5.



É constatado que o primeiro mecanismo ocorre quando os nitrosil complexos de rutênio apresentam ligantes como amina, carboxamida, tiolato, heme e fenolato, já no segundo os complexos têm na esfera de coordenação ligantes polipiridínicos e base de Schiff. Nesse mecanismo o retorno da espécie Ru^{2+} , após a fotólise, parece proceder de uma redução espontânea da espécie transitória Ru^{3+} . Analisando os complexos 1 e 2, as irradiações apresentaram perfil compatível com o produto final do segundo mecanismo, devido às semelhanças do metal, estado de oxidação e ligantes.^{54,74}

Com o intuito de ajudar nesta atribuição, foi realizado o acompanhamento eletroquímico desta reação (Figura 5). Nota-se que no primeiro ciclo voltamograma não há nenhuma espécie eletroativa na janela de potencial aplicado. Após 1 hora de irradiação com o LED azul, percebe-se o aparecimento de um processo eletroquímico em

0,590 V atribuído ao par redox $Ru^{III/II}$ do aqua complexo formado após a redução e liberação do óxido nítrico. Com base nesses resultados, constata-se um comportamento similar entre os dois compostos estudados neste trabalho com sistemas relacionados na literatura.^{70,71}

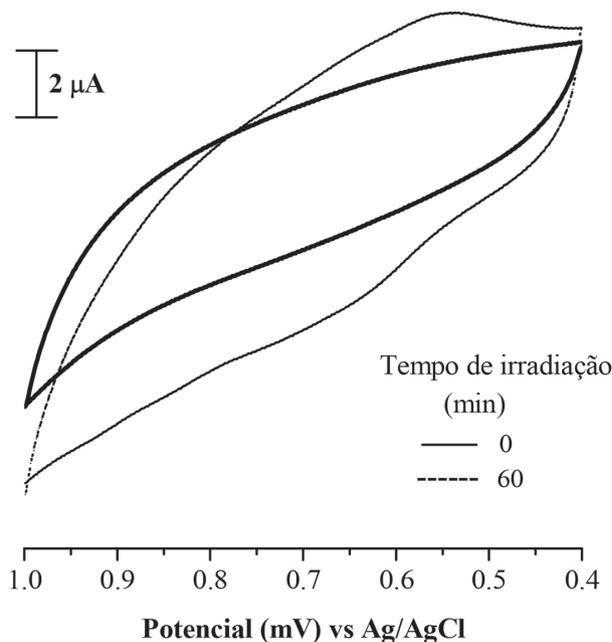


Figura 5. Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} do eletrodo de carbono vítreo em solução de $NaTFA$ 0,1 mol L^{-1} (pH = 3,5) contendo o composto 2 antes e depois da irradiação sob LED azul

Atividade antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa*

A atividade antibacteriana do nitrosilo complexo foi testada frente à bactéria de cepa gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC - 9027 (Figura 6). Desse modo, foi observado que o complexo 1 (Concentração Inibitória Mínima (CIM) = 121,5 mmol L^{-1}) é capaz de inibir o crescimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC - 9027) numa concentração bem menor que o complexo 2 (CIM > 500 mmol L^{-1}). Segundo a literatura, existem alguns fatores que são importantes no que diz respeito aos complexos metálicos apresentarem atividade antimicrobiana, dentre esses, estão o efeito quelato e a carga total dos complexos. Em relação ao efeito quelato, verifica-se que complexos formados por ligantes que se coordenam aos centros metálicos de forma bidentada, como a 1,10'-fenantrolina, a 2,2'-bipiridina e a 2,2'-dipiridilamina, apresentam maior eficiência antimicrobiana quando comparado a complexos que possuem ligantes monodentados, como a piridina. Já no caso da carga total dos complexos constata-se que a atividade antimicrobiana decresce na seguinte ordem: catiônico > neutro > aniônico.⁷⁵

Adicionalmente, relatos da literatura demonstra que os ligantes bipiridina, fenantrolina, 4-nitroimidazol e tiouréia livres de coordenação não possuem atividade antibacteriana. Dessa forma, a capacidade de inibir o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* é decorrente de características intrínsecas do complexo formado, não sendo atribuída isoladamente a cada um dos ligantes. A concentração inibitória mínima (CIM) reportada para as hidrazonas e seus complexos de cobre (II) contra *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram valores que variam de 232 $\mu mol L^{-1}$ a valores maiores que 570 $\mu mol L^{-1}$.⁷⁶ Além disso, elevados valores da CIM obtidos, na faixa entre 1532 a 1357 $\mu mol L^{-1}$, referentes à coordenação do Cu(II) a derivados de tiossemicarbonas, sulfatiazol e nimesulida,⁷⁷ e do composto $[Ru(mctz)(bpy)(dppf)]PF_6$ descritos na literatura (CIM > 500 mmol L^{-1}),⁷⁸ não foram considerados

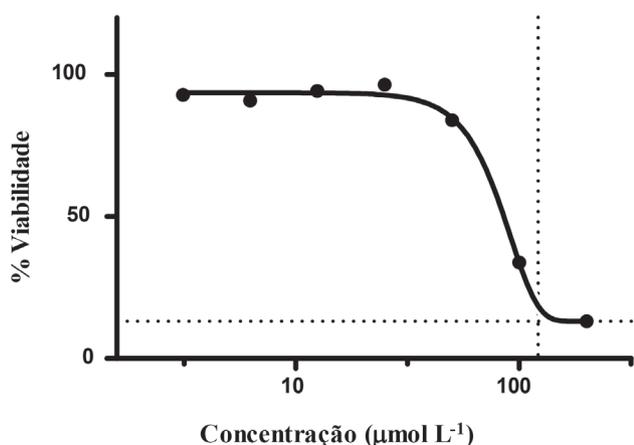


Figura 6. Porcentagem de viabilidade do inóculo pela concentração do complexo 1 frente as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*

como uma boa alternativa frente a essa bactéria Gram-negativa.⁷⁹ Com isso, pode-se observar que o composto em estudo apresenta menor concentração para inibir o crescimento de bactérias gram-negativas, indicando que o mesmo pode ser considerado um bacteriostático.

CONCLUSÃO

Os novos nitrosil complexos de rutênio foram obtidos com eficiência de acordo com as técnicas analisadas, sendo capazes de liberar NO por irradiação com luz azul e redução eletroquímica. Ao analisar os ensaios antibacterianos frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se que composto 1 apresentou maior capacidade de inibir o crescimento dessa bactéria Gram-negativa em comparação a sistemas relatados na literatura,⁷⁵⁻⁷⁹ podendo ser considerado como bacteriostático.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre, espectros eletrônicos de acompanhamento da interconversão NO⁺/NO₂⁻ dos compostos (Figura 1S), espectros vibracionais na região do infravermelho para os nitrosil complexos (Figura 2S), dados referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos ligantes fenantrolina e bipyridina (Tabela 1S), espectros de ressonância magnética nuclear 2D dos compostos (Figuras 3S e 4S), representação estrutural dos compostos (Figura 5S), voltamogramas de onda quadrada (Figuras 6S e 7S) e espectros eletrônico mostrando a mudança do perfil em função da exposição à luz azul (Figura 8S).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. À Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho - Universidade Federal do Ceará (CENAPAD), em particular a Tércio de F. Paulo, pela contribuição nos cálculos teóricos. Ao laboratório de Microbiologia Clínica em nome de Mafisa Rocha Abrantes da UFRN pela realização dos ensaios antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- Ignarro, L. J. B.; *Nitric Oxide: Biology and Pathology*, Academic Press: Cambridge, 2000.
- Sauaia, M. G.; Lima, R. G.; Tedesco, A. C.; Silva, R. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14718.
- Yetik-Anacak, G.; Catravas, J. D.; *Vasc. Pharm.* **2006**, *45*, 268.
- Sotirov, E.; Dobрева, G.; Noeva, A.; Papisov, M.; *General Pharmacology: The Vascular System.* **1996**, *27*, 395.
- Moncada, S.; Higgs, E. A.; *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 193.
- Vincent, S. R.; *Prog. in Neurob.* **2010**, *90*, 246.
- Zullino, S.; Buzzella, F.; Simoncini, T.; *Vasc. Pharm.* **2018**, *110*, 71.
- Thomas, S. R.; Witting, P. K.; Drummond, G. R.; *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, *10*, 1713.
- Costa, E. D.; Silva, J. F.; Aires, R. D.; Garcia, D. C.; Kansao, M. J.; Wainstein, A. J.; Rezende, B. A.; Teixeira, M. M.; Silva, R. F.; Cortes, S. F.; Lemos, V. S.; *Nitric Oxide.* **2018**, *80*, 98.
- Mel, A.; Murad, F.; Seifalian, A. M.; *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5742.
- Socco, S.; Bovee, R. C.; Palczewski, M. B.; Hickok, J. R.; Thomas, D. D.; *Pharm. Res.* **2017**, *121*, 52.
- Silva, J. J. N.; Osakabe, A. L.; Pavanelli, W. R.; Silva, J. S.; Franco, D.; *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 112.
- Sülz, L.; Astorga, G.; Bellele, B.; Iturriaga, R.; Mackay-sim, A.; Bacigalupo, J.; *Nitric Oxide* **2009**, *20*, 238.
- Gomes, A. J.; Espreafico, E. M.; Tfouni, E.; *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 544.
- Wang, Y.; Chen, M.; Hong, H.; Wang, Y.; Li, Q.; Liu, H.; Yang, M.; Hong, F.; Yang, S.; *Arc. Med. Res.* **2018**, *49*, 219.
- Lok, H. C.; Sahni, S.; Richardson, V.; Kalinowski, D. S.; Kovacevic, Z.; Lane, D. J. R.; Richardson, D. R.; *Free Rad. Biol. Med.* **2014**, *75*, 14.
- Figueiredo, L. E.; Cilli, E. M.; Molina, R. A. S.; Espreafico, E. M.; Tfouni, E.; *Inor. Chem. Commun.* **2013**, *28*, 60.
- Tfouni, E.; Truzzi, D. R.; Tavares, A.; Gomes, A. J.; Figueiredo, L. E.; Franco, D. W.; *Nitric Oxide* **2012**, *26*, 38.
- Caramori, G. F.; Ortolan, A. O.; Parreira, R. L. T.; Silva, E. H.; *J. Org. Chem.* **2015**, *54*, 799.
- Roose, M.; Sasaki, I.; Bukhanko, V.; Mallet-Ladeira, S.; Barba-Barba, R. M.; Ortiz, G. R.; Enriquez-Cabrera, A.; Farfán, N.; Lacroix, P. G.; Malfant, I.; *Polyhedron* **2018**, *151*, 100.
- Moreno, Y.; Spodine, A.; Vega, A.; Saillard, J.; *Inor. Chim. Acta* **2003**, *350*, 651.
- Bencini, A.; Lippolis, V.; *Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2096.
- Donnici, C. L.; Oliveira, I. M. F.; Temba, E. S. C.; Castro, M. C. R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 668.
- Krishnamurti, C.; Saryan, L. A.; Petering D. H.; *Cancer Res.* **1980**, *40*, 4092.
- Smith, A. P.; Frases, L.; *Comp. Coord. Chem. II* **2005**, *1*, 1.
- Kellett, A.; Howe, O.; O'connor, M.; Mccann, M.; Creaven, B. S.; Mcclean, S.; Kia, A. F.; Case, A.; Devereux, M.; *Free Rad. Biol. Med.* **2012**, *53*, 564.
- Mengjun, C.; Jianding, C.; Mohamed, T.; *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 1531.
- Barbosa, G. A.; Silva, J.; Appelt, P.; Fuganti, O.; Murakami, F. S.; Araujo, M. P.; *Inorg. Chem. Commun.* **2018**, *90*, 108.
- Luo, H.; Xia, Y.; Sun, B.; Huang, L.; Wang, X.; Lou, H.; Zhu, X.; Weidong P., W.; Zhang, X.; *Biochem. Res. Intern.* **2017**, *1*.
- Bolla, P. K.; Kalhapure, R. S.; Rodriguez, V. A.; Ramos, D. V.; Dahl, A.; Renukuntla, J.; *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2019**, *49*, 6.
- Alekshun, M. N.; Levy, S. B.; *Elsevier Inc.* **2007**, 1037.
- Zhou, Y.; Liu, M.; Rugaie, A.; Osman, R.; Lekong, X.; Alsam, S.; Battah, S.; Yuanxie, Y.; Hilder, R. C.; Zhou, T.; *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *55*, 146.
- Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 667.
- Rocha, D. P.; Pinto, G. F.; Rugiero, R.; Oliveira, C. A.; Guerra, W.; Fontes, A. P. S.; Tavares, T. T.; Marzano, I. M.; Maia, C. P.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 111.
- Ventola, C. L.; *Pharmacy and Therapeutics* **2015**, *40*, 277.

36. Meyer, E.; Gastmeier, P.; Deja, M.; Schwab, F.; *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303*, 388.
37. Kumar, M.; Sodhi, K. K.; Singh, P.; Agrawal, P. K.; Singh, D. K.; *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* **2019**, *11*, 1.
38. Kalhapure, R. S.; Sonawane, S. J.; Sikwal, D. R.; Jadhav, M.; Rambharose, S.; Mocktar, C.; Govender, T.; *Colloid Surf., B* **2015**, *136*, 651.
39. Santi, E.; Facchin, G.; Faccio, R.; Barroso, R. P.; Costa-filho, A. J.; Borthagaray, G.; Torre, M. H.; *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *155*, 67.
40. Grabchev, I.; Yordanova, S.; Bosch, P.; Vasileva-tonkova, E.; Kuveva, R.; Stoyanov, S.; Stoyanova, R.; *J. Mol. Struct.* **2017**, *1130*, 974.
41. Apohan, E.; Yilmaz, U.; Yilmaz, O.; Serindag, A.; Küçükbay, H.; *J. Organomet. Chem.* **2017**, *828*, 52.
42. Penha, D. P. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2018.
43. Becke, A. D.; *Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
44. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G.; *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
45. Casida, M. E.; Jamorski, C.; Casida, K. C.; Salahub, D. R.; *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439.
46. Mennucci, B.; Cance, E.; Tomasi, J.; *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506.
47. Wadt, W. R.; Hay, P. J.; *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299.
48. Jensen, F.; *Introduction to Computational Chemistry*, 2nd ed., John Wiley: Hoboken, 2007.
49. O'Boyle, N. M.; Tenderholt, A. L.; Langner, K. M.; *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 839.
50. Cockerill, F. R.; Wikler, M. A.; Alder, J.; Dudley, M. N.; Eliopoulos, G. M.; Ferraro, M. J.; Hardy, D. J.; Hecht, D. W.; Hindler, J. A.; Patel, J. B.; Powell, M.; Swenson, J. M.; Thomson, Jr., R. B.; Traczewski, M. M.; Turnidge, J. D.; Weinstein, M. P.; Zimmer, B. L.; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., 2012, p. 32.
51. Callahan, R. W.; Meyer, T. J.; *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 574.
52. Boonyavongsa, N.; Suwanruji, P.; Hannongbua, S.; Li, F.; Sunc, L.; Karpkirda, T. M.; *J. Photochem. Photobiol., A* **2014**, *287*, 40.
53. Li, J.; Sum, Y.; Zhu, Z.; Zhao, H.; Tan, L.; *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *161*, 128.
54. Cândido, M. C. L.; Oliveira, A. M.; Silva, F. O. N.; Holanda, A. K. M.; Pereira, W. G.; Sousa, E. H. S.; Carneiro, Z. A.; Silva, R. S.; Lopes, L. G. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 1824.
55. Pell, S.; Armor, J. N.; *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 873.
56. Silva, F. O. N.; Araújo, S. X. B.; Holanda, A. K. M.; Meyer, E.; Sales, F. A. M.; Diógenes, I. C. N.; Carvalho, I. M. M.; Moreira, I. S.; Lopes, L. G. F.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 2020.
57. Thompson, M. S.; Meyer, T. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5577.
58. Tfouni, E.; Krieger, M.; McGarvey, B. R.; Franco, D. W.; *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 57.
59. Holanda, A. K. M.; Silva, F. O. N.; Carvalho, I. M. M.; Batista, A. A.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Moreira, I. S.; Lopes, L. G. F.; *Polyhedron* **2007**, *26*, 4653.
60. Bottomley, F.; *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 158.
61. Rodrigues, F. P.; Carneiro, Z. A.; Mascharak, P.; Curti, C.; Silva, R. S.; *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 701.
62. Gomes, M. G.; Davanzo, C. U.; Silva, S. C.; Lopes, L. G. F.; Santos, P. S.; Franco, D. W.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1998**, 601.
63. Borges, S. S. S.; Davanzo, C. U.; Castellano, E. E.; Schpector, Z.; Silva, S. C.; Franco, D. W.; *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2670.
64. Lopes, L. G. F.; Wieraszko, A.; El-Sherif, Y.; Clarke, M. J.; *Inorg. Chim. Acta.* **2001**, *312*, 15.
65. Wieraszko, A.; Clarke, M. J.; Lang, D. R.; Lopes, L. G. F.; Franco, D. W.; *Life Sci.* **2001**, *68*, 1535.
66. Poelhsitz, G. V.; Bogado, A. L.; Souza, G. D.; Rodrigues-Filho, E.; Batista, A. A.; Araujo, M. P.; *Inor. Chem. Commun.* **2007**, *10*, 133.
67. Ford, P. C.; Bourassa, J.; Miranda, K.; Lee, B.; Lorkovic, I.; Boggs, S.; Kudo, S.; Laverman, L.; *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *171*, 185.
68. Kumar, A. Pandey, R.; Gupta, R. K.; Ghosh, K.; Pandey, D. S.; *Polyhedron* **2013**, *52*, 837.
69. Silva, C. D. S.; Pazc, I. A.; Abreu, F. D.; de Sousa, A. P.; Veríssimo, C. P.; Nilberto R.F. Nascimento, N. R. F.; Paulo, T. F.; Zampieri, D.; Eberline, M. N.; Gondim, A. C. S.; Andrade, L. C.; Carvalho, I. M. M.; Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. F.; *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 83.
70. Silva, F. O. N.; Penha, D. P. S.; Alencar, A. E. V.; Pontes, D. L.; Brito, A. C. F.; Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. F.; *Quim. Nova* **2018**, *41*, 400.
71. Sousa, A. P.; Fernandes, A. F.; Paz, I. A.; Nascimento, N. R. F.; Ellena, J.; Sousa, E. H. S.; Lopes, L. G. F.; Holanda, A. K. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 2117.
72. Carlos, R. M.; Ferro, A. A.; Silva, H. A. S.; Gomes, M. G.; Borges, S. S. S.; Ford, P. C.; Tfouni, E.; Franco, D. W.; *Inor. Chim. Acta* **2004**, *357*, 1381.
73. Lima, R. G.; Sauaia, M. G.; Bonaventura, D.; Tedesco, A. C.; Lopez, R. F. V.; Bendhack, L. M.; Silva, R. S.; *Inor. Chim. Acta* **2005**, *358*, 2643.
74. Rose, M. J.; Mascharak, P. K.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2093.
75. Efthimiadou, E. K.; Katsaros, N.; Karaliota, A.; Psomas, G.; *Inor. Chim. Acta.* **2007**, *360*, 4093.
76. Despaigne, A. A. R.; da Costa, F. B.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Louro, S. R. W.; Beraldo, H.; *Polyhedron* **2012**, 285.
77. Nunes, J. H. B.; de Paiva, R. E. F.; Cuin, A.; Ferreira, A. M. da C.; Lustrí, W. R.; Corbi, P. P.; *J. of Mol. Struct.* **2016**, *1112*, 14.
78. Appelt, P.; Silva, J. P.; Fuganti, O.; Aquino, L. E. N.; Sandrino, B.; Wohnrath, K.; Santos, V. A. Q.; Cunha, M. A. A.; Veiga, A.; Murakami, F. S.; Back, D. F.; Araujo, M. P.; *J. of Organomet. Chem.* **2017**, *846*, 326.
79. Ferraz, K. S. O. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2008.